Recherches sur le développement et la nutrition du sac embryonnaire et de l'endosperme des *Buddleia*;

PAR M. PAUL DOP.

A ma connaissance aucun travail n'a été publié sur l'embryogénie des *Buddleia*. C'est pour combler cette lacune importante en ce sens que la position systématique des *Buddleia* est mal connue, que j'ai entrepris ces recherches; c'est aussi dans le but d'étudier, sur un exemple convenable, la nutrition du sac embryonnaire et de l'endosperme. Il y a déjà longtemps Treub (29)[1] demandait « que les recherches embryologiques soient orientées vers les méthodes et les données de la physiologie, par exemple dans les cas d'embryogénie curieuse comme celle que révèlent les cæcums et les excroissances du sac embryonnaire dans les Scrofulariacées ». Comme il résultait d'observations préliminaires que j'avais faites, que l'endosperme des *Buddleia* possède des *cæcums* ou *suçoirs* ou *haustoriums* ou *appendices cotyloïdes*, très développés, j'ai pensé que ce serait un bon sujet d'études pour le but physiologique poursuivi.

J'ai suivi la formation du sac embryonnaire dans les deux espèces *B. variabilis* Hemsley et *B. curviflora* Hook. et Arn.; mais je n'ai pu étudier la formation et le développement de l'endosperme que dans *B. curviflora*, qui seul m'a fourni des fécondations et des fructifications régulières.

Au point de vue bibliographique, je n'ai indiqué que les références indispensables, renvoyant pour le reste le lecteur aux ouvrages classiques de Coulter et Chamberlain (5) pour la bibliographie jusqu'en 1903, et de Wettstein (33) pour la bibliographie récente.

TECHNIQUE.

Les ovaires, les fruits et les graines à divers états de développement ont été fixés au picro-formol acétique de Bouin. J'ai dû renoncer aux fixateurs osmiques tels que le liquide de Flem-

1. Les chiffres placés entre parenthèses renvoient à l'index bibliographique à la fin de l'article.

ming, dont la pénétration s'est montrée difficile et irrégulière; en outre le noircissement qu'ils occasionnent est très gênant et le blanchissement qu'ils nécessitent altère, par sa brutalité, les détails de la structure cellulaire. J'estime que le liquide de Bouin est, dans certains cas, le meilleur fixateur ovulaire que l'on connaisse. On sait d'ailleurs que cette opinion est aussi celle des botanistes de l'école de Louvain.

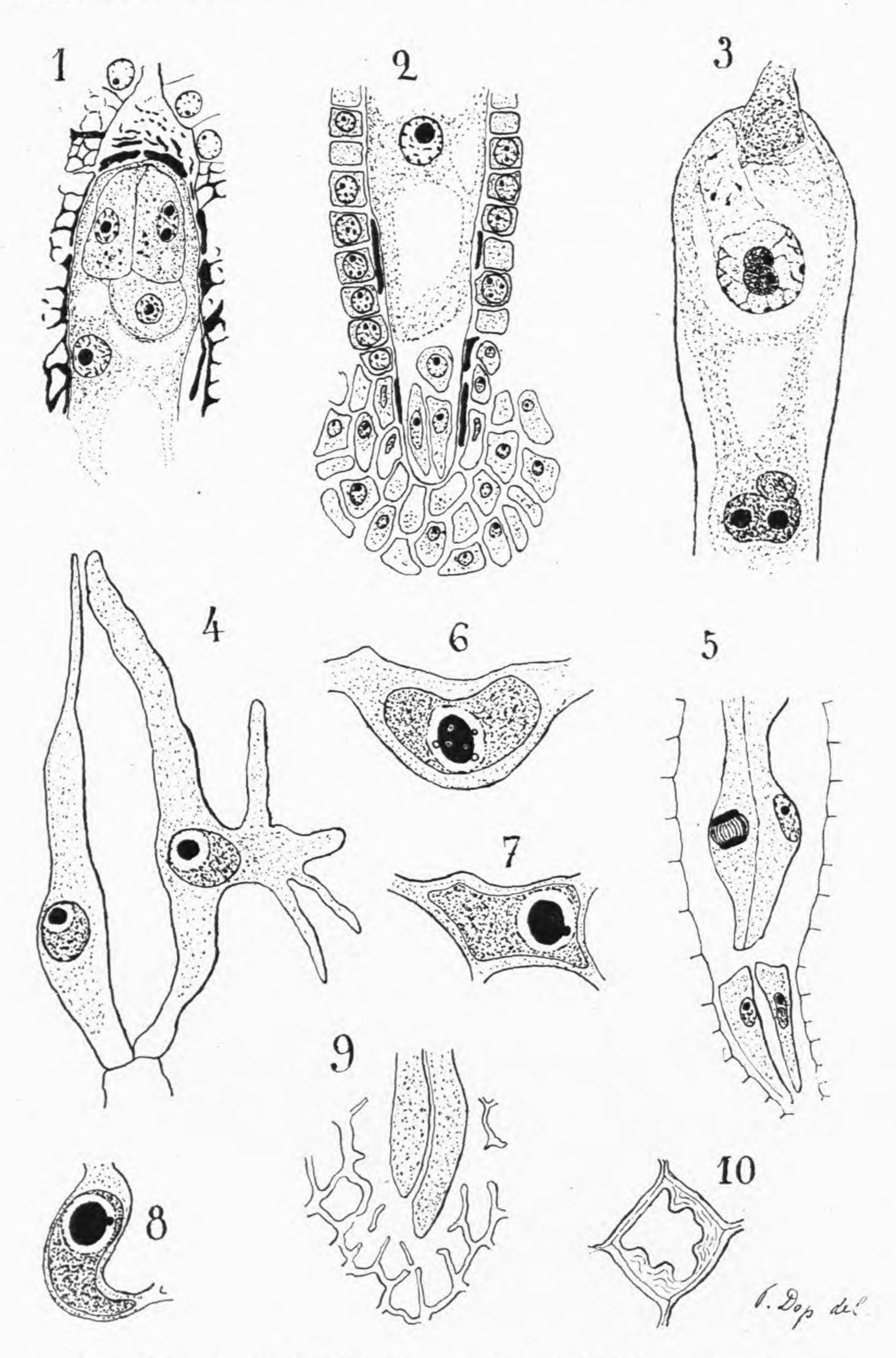
Les fixations ont toujours été longues (12 à 24 heures); les lavages à l'alcool à 70° très fréquents, sans exagération toutefois, car les traces d'acide picrique restant dans le matériel fixé disparaissent aisément dans les longs bains aqueux que nécessite la coloration des coupes. Celles-ci sont faites à des épaisseurs variant entre 4 et 10 μ. La coloration employée a été constamment celle à l'hématoxyline ferrique de M. Heidenhain, seule ou combinée avec un colorant plasmatique, la fuchsine acide, plus rarement le lichtgrün ou l'orange G. Étant donnée la longueur des manipulations qu'exige la technique de M. Heidenhain, il y a intérêt à posséder une méthode rapide de coloration permettant de juger la valeur d'une série de coupes. Pour cela j'ai employé le bleu polychrome de Unna, régressé soit au « glycerinœthermischung », soit au tannin-orange du même auteur. Cette dernière régression a l'avantage de donner, en même temps que la différenciation nucléaire, la coloration orange du cytoplasme.

Quant aux réactifs spéciaux que j'ai employés, ils seront indiqués dans le cours de cet exposé.

Les observations ont été faites aux objectifs apochromatiques (16, 8, 3 à sec et 3 et 1,5 à immersion homogène) et les oculaires compensateurs (8, 12, 18) de Zeiss. Les dessins ont été faits au miroir d'Abbe et les grossissements des dessins ont été évalués par rapport aux dimensiens réelles des objets mesurés au « mess-ocular ».

Formation du sac embryonnaire.

La formation du sac embryonnaire a lieu exactement par les mêmes processus dans les deux espèces étudiées. Je n'insisterai presque pas sur ces phénomènes qui sont conformes à ceux qui ont été si bien décrits par un grand nombre d'auteurs chez les



Développement de l'embryon du *Buddleia curviflora*.

Gamopétales. En particulier le sac embryonnaire des *Buddleia* se développe comme celui des Labiées, des Borraginées décrits par Guignard (12-1), des Scrofulariacées par Schmid (24) et de l'*Euphrasia Rostkoviana*, tout récemment décrit en détail par Würdinger (34).

Evolution de l'archéspore. — L'archéspore apparaît comme une grande cellule sous-épidermique du nucelle, qui est réduit lui-même à une seule assise dans sa plus grande partie, enveloppant l'archéspore. Celle-ci se divise directement suivant le schéma général en une file de 4 tétraspores. Les 3 supérieures dégénèrent rapidement, et l'inférieure va devenir le sac embryonnaire. Pendant la croissance de celui-ci les tétraspores supérieures sont résorbées, le nucelle également, et le sac embryonnaire arrive au contact de l'épiderme interne du tégument unique qui a pris sur ces entrefaites un grand développement en longueur et en épaisseur. Il s'est ainsi constitué un long canal micropylaire. Au contact du sac embryonnaire l'épiderme interne du tégument prend la forme et les caractères si fréquents chez les Gamopétales d'un *tapetum*.

En somme, et c'est pour cela qu'il n'y a pas lieu d'y insister plus longtemps, le sac embryonnaire des *Buddleia* se développe exactement comme chez la plupart des Scrofulariacées par par exemple.

Sac embryonnaire adulte.

Pendant que les tétrades se constituent, des modifications importantes se produisent dans les tissus de l'ovule.

Comme je l'ai déjà dit, les 3 tétraspores supérieures sont d'abord résorbées; puis le nucelle subit le même sort; de ces éléments résorbés qui servent sans doute à la nutrition du sac embryonnaire, on trouve des traces sous forme de masses qui fixent énergiquement la laque ferrique d'hématoxyline et qui sont accolées entre le sac embryonnaire et le tégument (Pl. I, fig. 1). Ces débris sont particulièrement abondants au niveau de la tétrade supérieure. Les cellules du tégument qui avoisinent la tétrade supérieure en voie de formation, celles qui forment la base du canal micropylaire, sont en même temps le siège d'une abondante formation d'amidon. J'ajoute que dans

cette région de la tétrade supérieure le tégument ne revêt pas les caractères d'un tapetum.

Au-dessous de cette région, se trouve le tapetum qui n'est pas autre chose, je l'ai déjà dit, qu'une partie de l'épiderme interne du tégument dont les cellules ont pris une disposition régulière et caractéristique. Le tapetum m'a toujours paru dépourvu d'amidon (Pl. I, fig. 2).

Enfin dans la région tout à fait inférieure du sac, autour du groupe antipodial en voie de différenciation, le tapetum n'existe plus en tant que tissu caractérisé par la forme de ses éléments, l'assise contiguë à l'extrémité du sac ayant les mêmes caractères que les assises profondes de la chalaze. A cet état cette zone antipodiale ou chalazienne ne renferme jamais d'amidon (Pl. I, fig. 2).

Fig. 1. — Coupe schématique d'un ovule au moment de la fécondation. — *p.*, zone chalazienne pectosique; *t.*, tapetum; *m.*, micropyle; *a.*, zone riche en amidon. Gr. : 170.

Ainsi donc autour du sac embryonnaire sur le point d'être adulte existent de haut en bas trois régions nettement distinctes qu'il y a lieu d'étudier séparément. (Fig. 1, ci-contre).

1° ***Région de la tétrade supérieure*** (Pl. I, fig. 1). — Cette région est caractérisée par ce fait que les cellules qui limitent la zone interne du tégument sont le siège d'un double phénomène : elles se chargent de grains amylacés, puis elles subissent une dégénérescence et une dislocation complète. Je ne me suis pas arrêté à observer le mécanisme de la formation des grains d'amidon si bien connu aujourd'hui par les travaux de Guilliermond, d'autant plus que le fixateur employé ne permet pas, par sa teneur en acide acétique, l'observation des formations mitochondriales. Quoi qu'il en soit, quand la cellule est remplie de grains d'amidon, le cytoplasme forme un réseau colorable par l'hématoxyline ferrique, dans les mailles duquel se trouvent les grains amylacés. Peu après le noyau dégénère soit par karyor-

rhexis, soit par pycnose, comme J. Bonnet (4) l'a observé dans les cellules-tapètes du pollen; puis il semble se dissoudre et disparaître. Les cellules se disloquent alors et leur réserve amylacée est très certainement absorbée par les synergides. D'ailleurs cet amidon subit les transformations chimiques bien connues, telles que la transformation en amylodextrine, facile à mettre en évidence par le réactif iodo-ioduré. La région supérieure du sac embryonnaire se développe donc en rongeant pour ainsi dire le tégument ovulaire, de telle sorte qu'elle acquiert rapidement une dimension un peu plus large que le reste du sac embryonnaire. Ainsi se forme l'aspect en têtard de grenouille, très caractéristique du sac embryonnaire non seulement des *Buddleia*, mais encore de beaucoup d'autres Gamopétales, comme l'ont montré de nombreux auteurs.

Il est important de noter que tout autour du canal micropylaire apparaît une abondante formation d'amidon qui servira plus tard à la nutrition de l'endosperme.

Je signale en outre que je n'ai jamais rencontré d'amidon dans le sac embryonnaire des *Buddleia*, contrairement à ce qui se passe dans un grand nombre de plantes, particulièrement les plantes grasses.

2° ***Région moyenne et inférieure du sac, zone du tapetum*** (Pl. I, fig. 2). — Cette région, qui correspond à la partie du sac occupé par les 2 noyaux polaires au moment de l'anthèse, est caractérisée par la disposition de l'épiderme interne du tégument en un tapetum dont les cellules se reconnaissent à leur disposition régulière, à l'abondance et à l'acidophilie de leur cytoplasme, à l'absence d'amidon et à la présence d'un noyau volumineux muni de 2 ou 3 nucléoles et d'une charpente chromatique abondante.

Anciennement observée par Hofmeister (14), qui la considère comme un caractère exclusif des Monochlamydées, plus récemment par Strasburger (27), Warming (31), etc., cette assise a été désignée par des appellations différentes selon la conception que les botanistes se sont faite de son rôle. Hofmeister (14) l'appelle « assise de revêtement », Schwere (25) « endothelium », Gœbel (9) « éphithelium ou tapetum », et cette dernière appellation est adoptée par la plupart des auteurs : Balicka-Iwa-

nowska (1), Billings (3), Guérin (11), Schmid (24), Würdinger (34), etc. Peltrisot (23) l'appelle dans les Ericacées « assise épithélioïde ». En conformité avec les idées de Guignard (12-2), Souèges (26-1) chez les Solanacées, Lavialle (17) chez les Composées l'appellent « assise digestive », appellation mieux en rapport avec son rôle physiologique. Ce rôle a été longuement discuté. Hegelmaier (13) attribue au tapetum un rôle protecteur vis-à-vis de l'endosperme. Balicka-Iwanowska (1) admet que les cellules-tapètes « possèdent probablement un ferment dans leur contenu mucilagineux et semblent exercer une fonction digestive, car elles persistent tandis que les tissus avoisinants sont désagrégés. Elles entourent les parties en voie d'accroissement, ayant par conséquent besoin d'une nutrition active ». Cette idée d'un rôle digestif à l'égard du tégument et nutritif à l'égard de l'endosperme est adoptée par Billings (3). Schmid (24) s'attache à démontrer la non-existence chez les Scrofulariacées d'une fonction nutritive vis-à-vis de l'endosperme, et ses principaux arguments sont les suivants :

1° Le tapetum s'étend seulement toujours sur la partie moyenne et inférieure du sac, et manque là où est l'œuf et où le besoin de nutrition est le plus intense.

2° Les cellules-tapètes ont sur leur cloison interne une cuticule (tout comme la paroi du sac) et celle-ci si elle n'arrête pas les échanges, doit les ralentir.

3° Quand l'endosperme se constitue, ses cellules limitantes ne montrent absolument pas que la nourriture leur afflue de ce côté-là, tandis qu'elles le montrent au niveau des haustoriums. Pour ces raisons Schmid (24) considère le tapetum comme un « embryonales Gewebe » qui ne joue aucun rôle, au moins avant la fécondation.

Cette opinion doit être tenue pour exacte. A aucun moment donné le tapetum des *Buddleia* n'apparaît comme une assise nourricière. Il n'offre aucun des caractères cytologiques si bien étudiés dans les tapètes nourriciers du pollen, par J. Bonnet (4). Cette assise ne joue aucun rôle dans la nutrition du sac embryonnaire. Ce n'est qu'après la fécondation qu'apparaît sa fonction physiologique, qui est dans beaucoup de cas, comme Guignard (12-2) l'a découvert et comme ses élèves l'ont vérifié,

de digérer la partie interne du tégument. Cette question sera d'ailleurs traitée plus loin.

Il est important de noter que dans le *B. variabilis*, le tapetum est plus différencié que dans le *B. curviflora*; de plus, dans aucune de ces 2 espèces le rouge Sudan ou l'orcanette n'ont mis en évidence la cuticule des parois internes, signalée par Schmid (24) chez les Scrofulariacées.

3° ***Région antipodiale et chalazienne*** (Pl. I, fig. 2). — Comme je l'ai déjà dit, l'amidon fait défaut dans cette région. Par contre les éléments cellulaires constitutifs m'ont présenté des réactions caractéristiques qui m'ont permis de préciser, ce qui à ma connaissance n'a pas encore été fait, le rôle physiologique de cette région de l'ovule, tout au moins dans les *Buddleia*.

Les membranes, très épaisses, atteignant facilement 3-4 μ d'épaisseur au moment de l'anthèse, se comportent ainsi aux réactifs suivants :

Elles fixent d'une façon élective les couleurs d'aniline basique. Le bleu de toluidine, régressé à l'essence de girofle, colore exclusivement les membranes de la région chalazienne, en bleu dans le *B. curviflora*, en violet dans le *B. variabilis*. Le bleu de méthylène polychrome regressé au « glycerinœthermischung » se comporte de même, en donnant dans les 2 espèces une teinte bleue un peu violacée.

Le rouge de ruthénium, employé selon les techniques indiquées par Mangin (20), colore d'une façon élective les membranes de la région chalazienne *dans toute leur épaisseur*, tandis que, dans les autres cellules de l'ovule, il ne colore strictement que la lamelle moyenne.

Les colorants salins de Devaux (7) et de Petit (23), obtenus par exemple par l'action successive du chlorure ferrique et du ferrocyanure de potassium, colorent exclusivement ces membranes, *dans toute leur épaisseur*.

Le cytoplasme de ces cellules est peu chromophile, et le noyau de petite taille; en elles les éléments métachromatiques, dont on connaît le rôle dans les cellules nourricières, m'ont paru faire défaut.

Les réactions que je viens de décrire indiquent nettement que les membranes des cellules de la région chalazienne sont